

SILVIA FORTI e SILVIA COCITO  
ENEA - Crea S. Teresa C.P. 316, I-19100 La Spezia

## MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE E MICROSONDA: ESEMPI DI APPLICAZIONE AGLI STUDI ECOLOGICI DI AMBIENTI MARINI COSTIERI

### RIASSUNTO

L'osservazione in Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) associata ad un sistema di Spettrometria in Dispersione di Energia (EDAX) ha permesso di portare un nuovo contributo agli studi ecologici di sistemi marini costieri.

È stata in particolare sottolineata l'importanza della microanalisi nell'individuazione di certi inquinanti inorganici e nella caratterizzazione dell'evoluzione rapida delle condizioni fisico-chimiche di un ambiente. In particolare sono stati considerati sedimenti superficiali marini e il particolato sospeso, ma anche materiali prelevati in ambienti ancora poco conosciuti come le grotte marine sommerse.

### SUMMARY

## SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND MICROANALYSIS: EXAMPLES OF APPLICATION TO ECOLOGICAL INVESTIGATIONS OF COASTAL MARINE SYSTEMS.

Through the observation by Scanning Electron Microscopy (SEM) associated with an Energy Dispersion Spectrometer (EDAX) it has been possible to bring a new contribution to ecological studies of marine coastal systems.

The importance of microanalysis has been underlined for the determination of inorganic pollutants and for the characterization of physico-chemical conditions rapid evolution in some particular

ecological systems. In particular surficial sediments and suspended particulate matter are considered but also some micronodules collected in submerged marine caves have been studied.

Key words: Electron microscopy, ecology, marine environment.

## INTRODUZIONE

Questo lavoro vuole evidenziare, tramite alcuni esempi applicativi, come la Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) e la Spettrometria in Dispersione di Energia (EDAX) contribuiscano con preziose informazioni di dettaglio alla definizione ecologica di un ambiente. Tale metodo analitico offre infatti la possibilità di associare ad una immagine ad alta definizione una analisi chimica immediata e puntiforme, requisito importante nello studio di forme organiche ed inorganiche presenti nell'ambiente.

Gli esempi riportati si riferiscono all'indagine ambientale di un sistema marino costiero: si è rivolta particolare attenzione al particellato sospeso, alla sua caratterizzazione e ai processi di trasferimento degli inquinanti organici e inorganici che esso favorisce nella colonna d'acqua e nei sedimenti superficiali.

In generale, i fattori biotici ed abiotici che determinano lo stato ecologico di un ambiente subiscono continue trasformazioni sia naturali che dovute all'azione dell'uomo; tali evoluzioni possono essere rapide e per comprenderne i meccanismi si rende necessario focalizzare l'attenzione su dettagli morfologici e analitici.

## NOTE TECNICHE

È stato utilizzato un Microscopio Elettronico Philips 515 associato ad uno Spettrometro in Dispersione di Energia EDAX PV9100, schematizzato in fig. 1. Nella colonna elettronottica gli elettroni incidenti (primari) colpiscono il campione con una certa energia producendo i seguenti segnali: elettroni secondari di bassa energia (immagine tridimensionale), elettroni secondari di alta energia o retrodiffusi (individuazione degli elementi ad alto numero atomico), fotoni X (analisi chimica immediata). Tali interazioni possono essere sfruttate solo se la materia che deve essere analizzata è resa conduttiva tramite metallizzazione con Au, Pd, C, ecc. a seconda del tipo di segnale che si vuole evidenziare. Nel sistema di analisi EDAX il rivelatore è costituito da un cristallo in Si-Li che si com-

porta come un semi-conduttore, attraverso il quale i fotoni X vengono selezionati in funzione del loro livello di energia. È quindi possibile ottenere una analisi immediata degli elementi maggiori, con numero atomico superiore a 10. L'oro, che permette di lavorare in alta risoluzione, presenta alcuni picchi che possono mascherare i segnali di altri elementi che si vogliono analizzare. È quindi opportuno utilizzare la grafite per ottenere delle analisi significative.

## PARTICELLATO SOSPESO

Il materiale raccolto su filtro rappresenta l'associazione delle particelle presenti in una determinata zona della colonna d'acqua che possono aver subito:

- trasporto per via fluviale ed erosione costiera (litoclasti, argille,...);
- risospensione dal sedimento superficiale (argille, bioderiti, ossidi-idrossidi,...);
- neogenesi e associazioni in situ (cloruri di metalli, ossidi-idrossidi, argille,...).

È quindi importante conoscere bene le zone di provenienza e valutare sia qualitativamente che quantitativamente i meccanismi che regolano i cicli di tali materiali in un ambiente costiero. In particolare i minerali argillosi possono giocare un ruolo importante nelle interazioni sia con certi metalli tossici che con la materia organica (COCITO et al., 1985). Il cloro è da prendere ugualmente in considerazione come veicolante importante di metalli.

I diversi metodi di preparazione dei campioni di particellato sospeso hanno dimostrato che è strettamente importante ottenere un preparato pulito su filtro Nuclepore di porosità  $0.4\ \mu\text{m}$  (in particolare il cloruro di sodio sotto forma cristallizzata o come ricopertura delle particelle ne nasconde le caratteristiche morfoscopiche).

I filtri vengono fissati su un portacampione in alluminio con nastro biadesivo e metallizzati con oro per una buona definizione fotografica, oppure con grafite per ottenere una analisi semiquantitativa affidabile.

Tutte le osservazioni e analisi si effettuano manualmente, contrariamente alle metodiche che riescono ad analizzare automaticamente e con più precisione le particelle, ma che non prendono più in considerazione una buona definizione dell'immagine (BERNARD e VAN GRIEKEN, 1986). Diversi lavori hanno potuto dimostrare l'importanza di una tale tecnica per capire certi meccanismi di associazione e dissociazione delle particelle, ed il loro ruolo nei processi di trasferimento orizzontale e verticale attraverso una colonna d'ac-

qua (SUNDBY et al., 1981; BISHOP et al., 1977; JEDWAB, 1978; OLSEN et al., 1981). Il problema da affrontare è complesso in quanto:

1 - gli elementi anomali ricercati sono estremamente rari quando si è lontani dalla sorgente rispetto al fondo naturale organico e inorganico (argille, quarzi, carbonati,...).

2 - il metodo di analisi globale non riesce a distinguere i metalli pesanti legati alle fasi principali da quelli che si trovano sotto una forma definita.

### *Esempi di caratterizzazione del particellato:*

1) Fly-ashes: ceneri volanti provenienti da combustione del carbone di una centrale termoelettrica situata nei pressi del porto di La Spezia. Dopo essere state classificate dal materiale di riabbattimento, le stesse particelle ( $>2\mu\text{m}$ ) sono state ritrovate nell'acqua del porto (fig. 2, fig. 3). È già stato evidenziato il trasporto per via atmosferica come meccanismo selettivo rispetto a granulometrie ancora più fini (LEFEVRE et al., 1984; DEL MONTE e SABBIONI, 1987).

2) Aggregati argillosi: sono stati individuati metalli di origine industriale (Cr) in aree antistanti zone industrializzate (fig. 4).

3) Forme non determinate: sono state trovate in particolare due forme morfologicamente differenti, contenenti quantità abbondanti di cloro, veicolanti rispettivamente P e Cu l'una (fig. 5) e Pb e Fe l'altra (fig. 6).

## SEDIMENTI

I sedimenti marini analizzati sono generalmente molto idratati perchè superficiali (poco coerenti), in maggioranza argillosi e contenenti una grande quantità di cloruro di sodio (NaCl). Sono stati messi a punto principalmente due metodi di preparazione dei sedimenti:

1 - analisi chimica globale. È un metodo rapido che permette di ottenere la composizione in elementi maggiori (espressa in % di peso di ossidi) di una piccola quantità (da 5 a 10 mg) perfettamente disidratata, macinata, omogeneizzata, sotto forma di pasticca di qualche mm di diametro. Il sistema EDAX non permette di valutare gli elementi contenuti in quantità  $<0.5\%$ , anche perchè mascherati dal NaCl; si tende quindi a lavorare su campioni possibilmente dializzati.

2 - Analisi chimica puntiforme. Sono state analizzate frazioni granulometriche prescelte di sedimenti argillosi, ma i risultati non

possono ancora essere significativi utilizzando questo metodo di dispersione (DUPLAY, 1984).

### *Esempi di analisi di sedimenti:*

1) Analisi morfologica. I sedimenti superficiali costieri hanno dimostrato essere un interessante campo applicativo in quanto l'osservazione di campioni prelevati in aree antistanti zone urbanizzate ha evidenziato la presenza di elementi inquinanti di origine antropica. Sono state osservate tracce di frammenti plastici generatisi probabilmente per fotodegradazione e ridotti soprattutto dall'attività del fouling batterico a dimensioni microscopiche (circa 10  $\mu\text{m}$ ), anche in corrispondenza di batimetriche relativamente elevate (500 m) (fig. 7). Numerose osservazioni al SEM (DEMPSEY, 1981) hanno dimostrato come sia possibile descrivere i meccanismi d'attacco su substrati diversi da parte di comunità batteriche particolarmente abbondanti in condizione di evidente inquinamento. Per diverse forme batteriche è stata messa in evidenza la produzione di un secreto mucoso che, legando le frazioni più fini del sedimento, ne può inibire il trasporto ed agire quindi come stabilizzante (fig. 8).

2) Analisi chimica globale e mappature Fe-S di campioni prelevati lungo una carota proveniente da ambiente ridotto (laguna del delta del Po). Le analisi sono abbastanza omogenee, ma si possono osservare certe zone dove sono concentrati i solfuri di ferro, forme mineralogiche tipiche di tali ambienti (35.4% S, 44% Fe; nei sedimenti mediamente 1% S, 9% Fe).

3) Analisi chimica globale della frazione totale di un sedimento superficiale. Grazie alle immagini di elettroni retrodiffusi (B. S.) sono state osservate microconcentrazioni di Hg associato a mineralizzazioni di Cr Ni (1.7% Hg, 7.3% Cr, 4.2% Ni) che non sono state messe in evidenza con altri metodi analitici. In effetti, il mercurio si trova concentrato nei sedimenti superficiali di aree costiere dove si sospetta una origine industriale oppure naturale dovuta all'estrazione di cinabro (HgS).

4) Analisi puntiforme di un micronodulo proveniente dalla grotta di Bergeggi (SV) (BIANCHI et al., 1986). Il micronodulo si presenta come una piccola sfera di circa 300  $\mu\text{m}$  di diametro; le analisi EDAX evidenziano una composizione in ferro (ossidi-idrossidi) con qualche traccia di manganese (fig. 9). Sulla superficie di questo nodulo sono epigenizzate delle micromineralizzazioni che presentano una composizione chimica tipica della Smectite-Nontronite (DE LANGE e RISPENS, 1986) (fig. 10.a). Queste stesse mineralizzazioni sono state in seguito localmente ricoperte da un nannonodulo di ferro (fig.

10.b). Questi noduli possono essere degli indicatori mineralogici delle peculiari condizioni di ossido-riduzione che caratterizzano le grotte oscure sommerse. In questo caso ci sarebbe una prima fase di precipitazione degli ossidi-idrossidi di ferro (micronodulo) in condizioni ossidanti, poi una seconda fase di neoformazione di minerali argillosi (Fe-Si) in condizioni riducenti, infine una terza fase di precipitazione di ossidi-idrossidi di ferro (nannonodulo) in condizioni nuovamente ossidanti. Diverse osservazioni in Mediterraneo hanno rivelato la presenza di incrostazioni di Fe e Mn sulle pareti delle grotte oscure, in particolare nelle parti confinate idrologicamente (HARME LIN et al., 1985; LABOREL e VACELET, 1959).

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Risulta evidente dagli esempi riportati l'importanza di un metodo analitico che, pur con informazioni di dettaglio, contribuisce allo studio e all'interpretazione di problematiche ambientali. Il SEM in particolare è ancora raramente utilizzato in studi ecologici, benchè abbia trovato alcune discipline più specialistiche di applicazione quali la medicina, la biologia, la geologia, la metallurgia,... Nelle indagini ambientali ha portato utili e nuove informazioni in quanto ha permesso di capire il quadro delle fenomenologie in cui si formano certe strutture (noduli, sedimenti superficiali) ed ha definito dinamicamente processi in corso (particellato, minerali indicatori di ambienti ossidanti o riducenti, ...).

Indagando sulla presenza ed influenza del materiale particellato e degli agenti inquinanti, si è riusciti in certi casi ad individuare le fonti di inquinamento, sia antropogeniche che naturali, e ad ipotizzare le vie attraverso le quali eventuali inquinanti diffondono nella massa d'acqua. È evidente quindi l'importanza di poter correlare le caratteristiche quali-quantitative del materiale sospeso con la presenza sia di materia organica che di agenti inquinanti, le loro interazioni e la formazione di complessi più o meno stabili. Da questo derivano problematiche associate all'intrappolamento e rimessa in circolo dei "complessi" formati, la loro diffusione anche entro i sedimenti.

Particolare interesse riveste l'osservazione e l'analisi di forme quali i fecal pellets sia nei processi di movimento verticale lungo la colonna d'acqua con conseguente trasporto di sostanza organica e metalli associati, sia nello studio del budget energetico degli ecosistemi. La presenza di organismi permanenti sul fondo in corrispondenza di zone ad elevata produttività biologica superficiale riflette

l'aumento nel trasporto di carbonio organico verso i sedimenti in tali aree (HEEZEN e HOLLISTER, 1971).

Quindi determinare i processi significativi che operano nella colonna d'acqua, trasformando le caratteristiche dei fecal pellets e del particolato in generale, contribuisce alla conoscenza di processi quali il riciclo dei nutrienti e la formazione dei sedimenti, processi basilari nello studio di un ecosistema marino.

# MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE + MICROSONDA

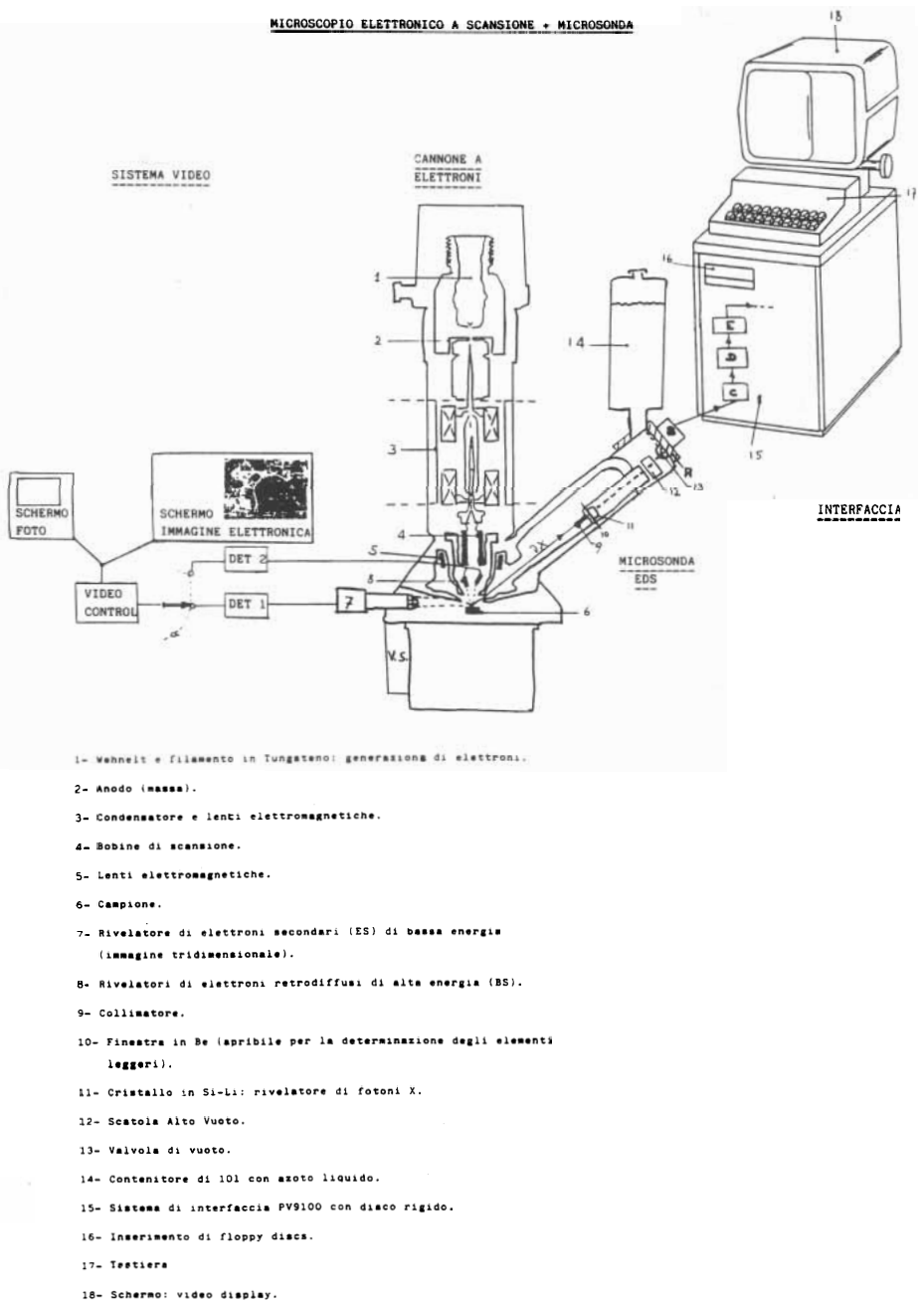


Fig. 1. Schema del SEM e del sistema EDAX. SEM and EDAX system scheme.



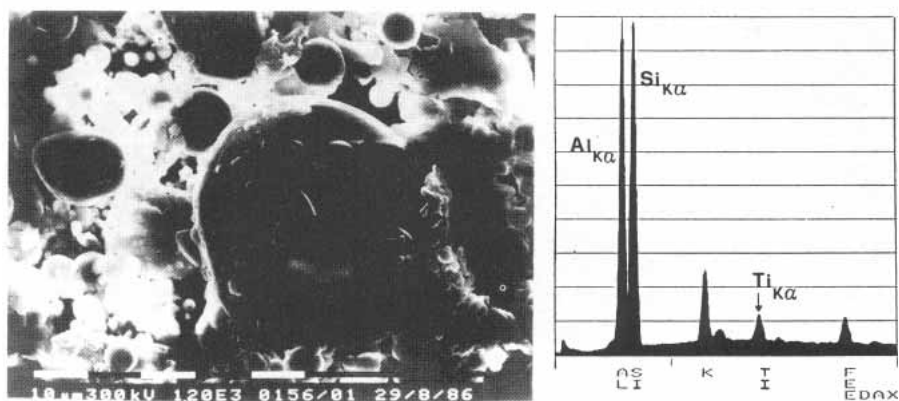


Fig. 2. Fly-ashes provenienti da una centrale termoelettrica nei pressi del porto di La Spezia (1200x) (a sinistra). Spettro di analisi EDAX (a destra). Fly-ashes coming from a thermal power plant near La Spezia harbour (1200x) (on the left). EDAX analysis spectrum (on the right).

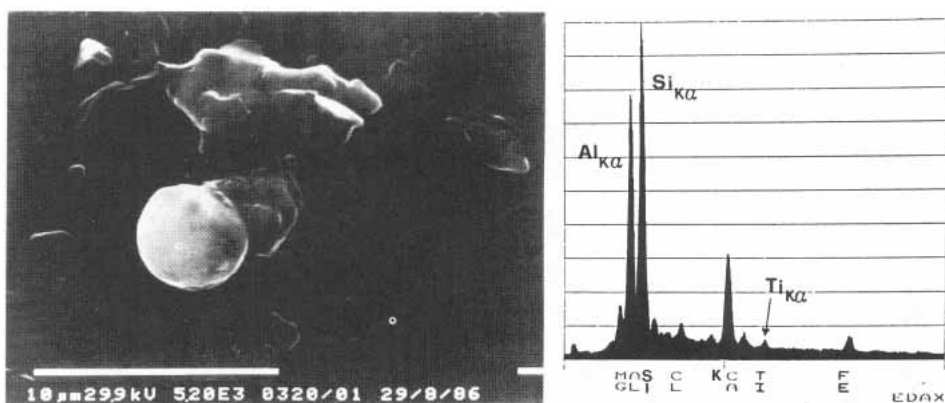


Fig. 3. Fly-ash riscontrato nel particolato sospeso delle acque superficiali del porto di La Spezia (5200x) (a sinistra). Spettro di analisi EDAX (a destra). Fly-ash found in surficial suspended particulate matter of La Spezia harbour waters (5200x) (on the left). EDAX analysis spectrum (on the right).

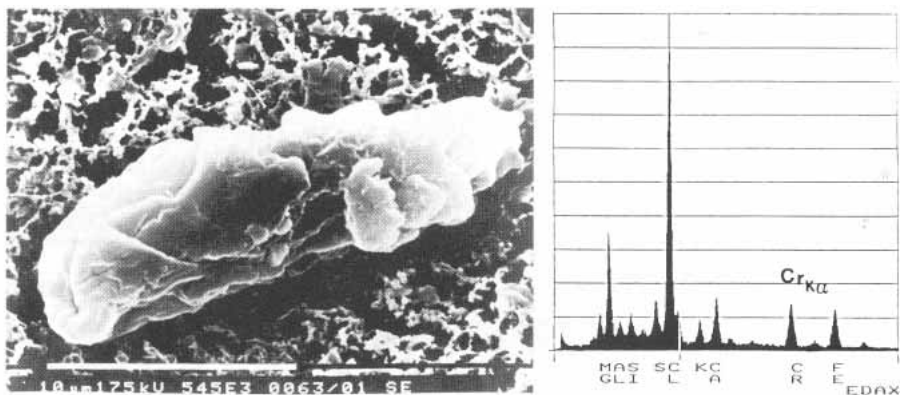


Fig. 4. Aggregato argilloso contenente Cr (5450x) (a sinistra). Spettro di analisi EDAX (a destra). Cr in a clayey aggregate (5450x) (on the left). EDAX analysis spectrum (on the right).

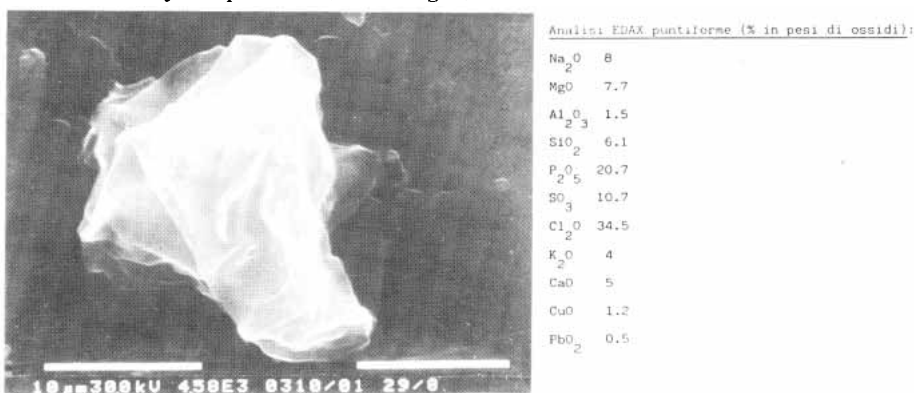


Fig. 5. Forma non determinata veicolante P e Cu (4580x) (a sinistra). Analisi EDAX (a destra). Undetermined form carrying P and Cu (4580x) (on the left). EDAX analysis (on the right).

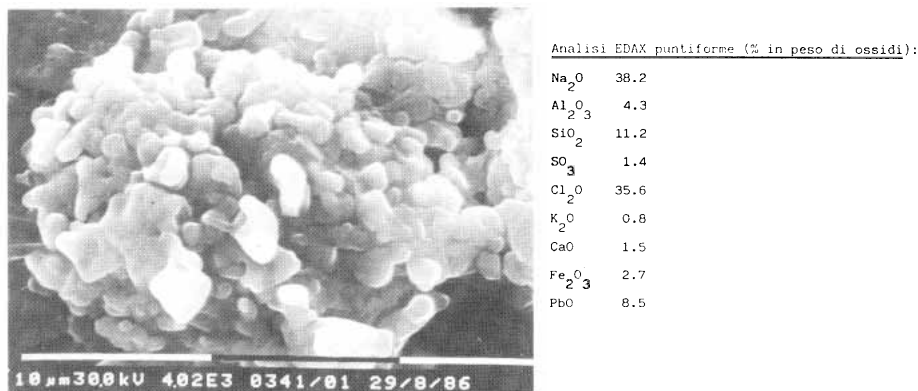


Fig. 6. Forma non determinata veicolante Pb e Fe (4020x) ( sinistra). Analisi EDAX(a destra). Undetermined form carrying Pb and Fe (4020x)(on the left). EDAX analysis (on the right).

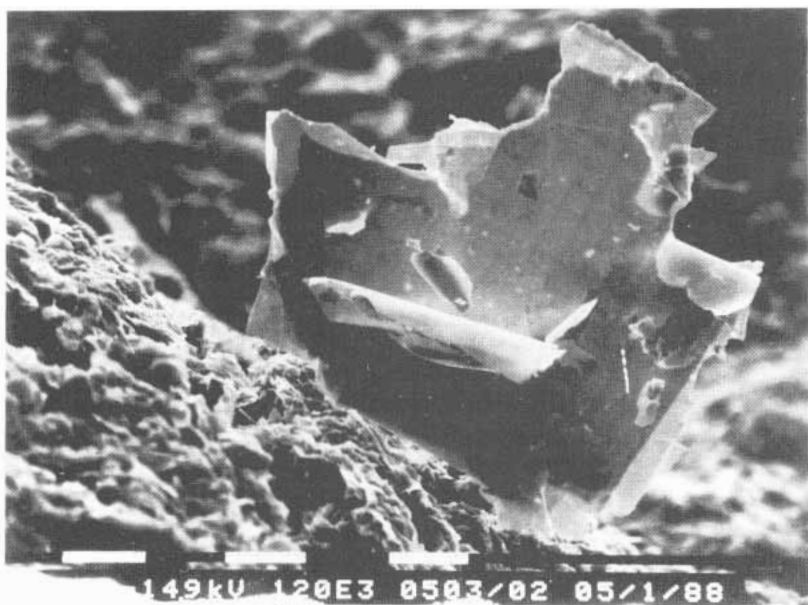


Fig. 7. Frammento plastico ritrovato in un sedimento superficiale (1200x).  
Plastic bit found in a surficial sediment (1200x).

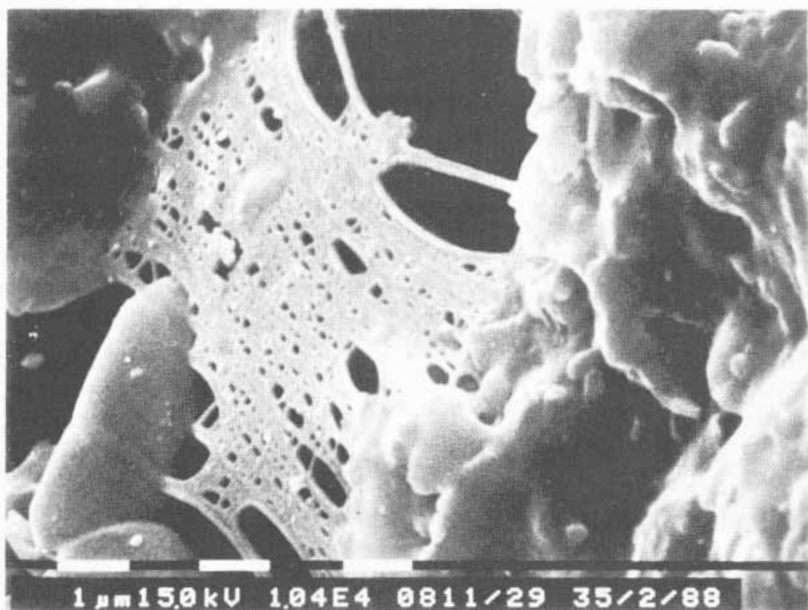


Fig. 8. Secreto mucoso in un sedimento superficiale (10400x). Mucus secretion  
in a surficial sediment (10400x).

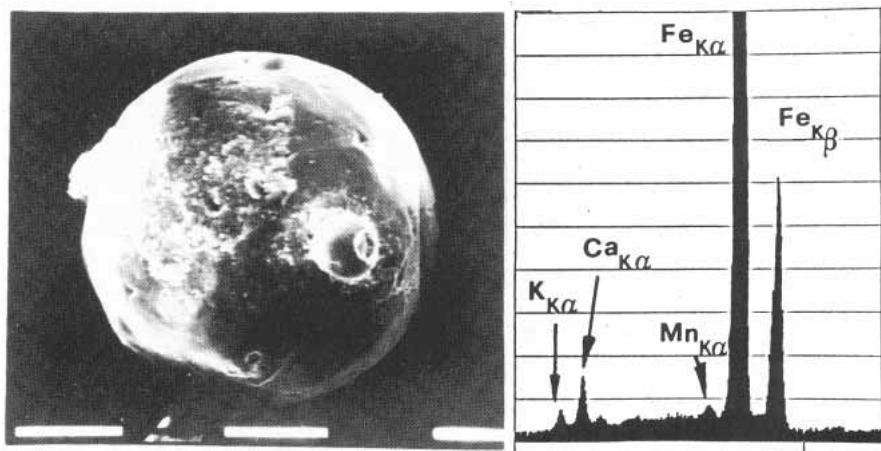


Fig. 9. Micronodulo rinvenuto nella grotta marina sommersa di Bergeggi (SV) (1500x) (a sinistra) e spettro EDAX (a destra). Micronodule found in the marine submerged cave of Bergeggi (SV) (1500x) ( on the left) and EDAX spectrum (on the right).

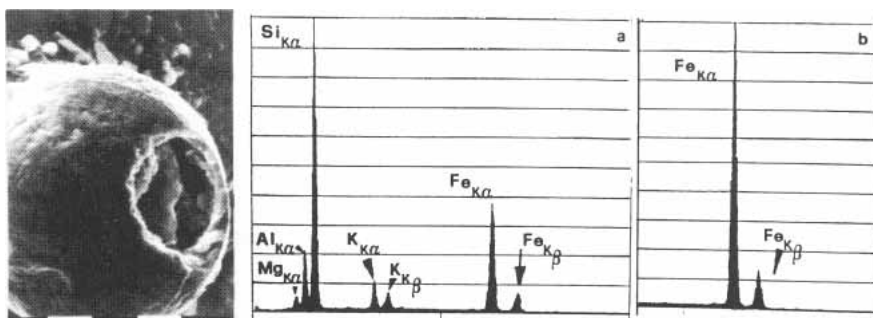


Fig. 10. Dettaglio della fig. 9: nannonodulo (7000x) (a sinistra); a-epigenesi vFe-Si, b-ricopertura in ossido di Fe. Spettri EDAX. Detail of fig. 9: nannonodule (7000x) (on the left); a-Fe-Si epigenesis, b-Fe oxide recovering. EDAX spectra.

## BIBLIOGRAFIA

- BERNARD P. C., VAN GRIEKEN R., 1986 - *Classification of Estuarine Particles Using Automated Electron Microprobe Analysis and Multivariate Techiques*, Environ. Sci Technol., 20 (5): 467-473.
- BIANCHI C. N., CEVASCO M. G., DIVIACCO G. e MORRI C., 1986 - *Primi risultati di una ricerca ecologica sulla Grotta sottomarina di Bergeggi (Savona)*, Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova, 52 suppl.: 267-293.
- BISHOP J. K. B., EDMOND J. M., KETTEN D. R., BACON M. P., SILKER W. B., 1977 - *The chemistry, biology and vertical flux of particulate matter from the upper 400m of the equatorial Atlantic Ocean*, Deep Sea Research, 24: 511-548.
- COCITO S., PICCAZZO M., TUCCI S., 1985 - *Distribuzione del particellato solido sospeso nelle acque del golfo di Genova. Implicazioni ambientali*, Atti Conv. ENEA S. Teresa: 171-192.
- DE LANGE G. J., RISPENS F. B., 1986 - *Indication of a diagenetically induced precipitate of an Fe-Si mineral in sediment from the Nares Abyssal Plain, Western North Atlantic*, Marine Geology, 73: 85-97.
- DEL MONTE M., SABBIONI C., 1987 - *Inquinamento atmosferico e degrado dei monumenti*, Atti XVI Cong. M. E. Bologna.
- DEMPSEY M. J., 1981 - *Marine Bacterial Fouling: A Scanning Electron Microscope Study*, Marine Biology, 61: 305-315.
- DUPLAY J., 1984 - *Analyses chimiques ponctuelles d'argiles*, Sci. Geol. Bull., 37 (4): 307-317.
- HERMELIN J., VACELET J., VASSEUR P., 1985 - *Les grottes soumarines obscures: un milieu extreme et un remarquable biotope refuge*, Tethys, 11 (3-4): 214-229.
- HEEZEN B. C., HOLLISTER C. D., 1971 - *The face of the deep*, Oxford Univ. Press, 658 pp.
- JEDWAB J., 1979 - *Copper, zinc and lead minerals suspended in ocean waters*, Geochim. et Cosmochim. Acta, 43 (1): 101-110.
- LABOREL J., VACELET J., 1959 - *Les grottes soumarine obscures en Mediterranee*, C. R. Acad. Sc. Paris, 248: 2619-2621.
- LEFEVRE R., GAUDICHET A., DE FELICE P., 1986 - *Caracterisation chimico mineralogique des flux microparticulaires dans la basse atmosphere de la Mediterranée moyenne*, C. R. Acad. Sc. Paris, 303 (13): 1215-1220.
- OLSEN C. R., CUTSHALL N. H., LARSEN I. L., 1982 - *Pollutant Particle associations and dynamics in coastal marine environments: a rievew*, Marine Chemistry, 11: 501-533.
- SUNBY B., SILVERBERG N., CHESSELET R., 1981 - *Pathways of manganese in an open estuarine system*, Geochim. et Cosmochim. Acta, 45: 293-307.